

# The role of NF- $\kappa$ B activation I fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle

Citation for published version (APA):

Hommelberg, P. P. H. (2011). *The role of NF- $\kappa$ B activation I fatty acid-induced insulin resistance in skeletal muscle*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20110225ph>

## Document status and date:

Published: 01/01/2011

## DOI:

[10.26481/dis.20110225ph](https://doi.org/10.26481/dis.20110225ph)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary



## SUMMARY

The skeletal muscle plays an important role in maintaining glucose metabolism, accounting for the majority of insulin-stimulated glucose uptake. Skeletal muscle insulin resistance, which can be defined as the reduced ability of muscle cells to respond to physiological levels of insulin, precedes the clinical diagnosis of type 2 diabetes mellitus. Currently, around 250 million people are having diabetes worldwide, a number that is rapidly increasing. In the last decades, it has become evident that increased free fatty acid (FFA) levels in plasma are associated with skeletal muscle insulin resistance. The molecular basis of skeletal muscle insulin resistance is still not elucidated, but substantial evidence supports a role for inflammatory signaling and the accumulation of lipid metabolites in insulin resistance in response to increased FA levels. The work described in this thesis is based on the use of two well-established skeletal muscle cell lines: the rat L6 skeletal muscle cells and the mouse C2C12 skeletal muscle cells. In a series of experiments, we determined the effects of different FAs and the role of lipid metabolite accumulation on insulin resistance. In addition, we investigated the role of the NF- $\kappa$ B pathway (an important inflammatory signaling pathway) in skeletal muscle insulin resistance.

Although previous research revealed that the long-chain saturated fatty acid (SFA) palmitic acid induces insulin resistance and NF- $\kappa$ B activation in muscle cells, a systematic evaluation of the effects of other FAs, classified according to chain length was lacking. Therefore, we evaluated the effects of SFAs differing in chain length on their ability to affect insulin sensitivity and activation of the NF- $\kappa$ B pathway in muscle cells (chapter 2). L6 and C2C12 myoblasts were differentiated into multinucleated myotubes and incubated with four different fatty acids: caprylic acid (C8:0), lauric acid (C12:0), palmitic acid (C16:0), and stearic acid (C18:0). Incubation of myotubes with the long-chain FAs C16:0 and C18:0 induced insulin resistance, as insulin-stimulated GLUT4 translocation and deoxyglucose uptake were decreased. In contrast, myotubes incubated with the medium-chain SFAs C8:0 and C12:0 remained insulin sensitive. Besides increasing NF- $\kappa$ B DNA binding activity in muscle cells, C16:0 also induced NF- $\kappa$ B transcriptional activity. C18:0 showed comparable effects, whereas the SFAs with shorter chain lengths did not elevate NF- $\kappa$ B transcriptional activity. Altogether, this demonstrated that SFA-induced NF- $\kappa$ B activation in muscle cells coincides with insulin resistance and depends on the chain length of the fatty acid.

Next, we investigated if the association between long-chain SFA-induced NF- $\kappa$ B activation and insulin resistance applied to long-chain FAs ( $\geq 16$  carbon atoms) in general. For this, we studied the effects of saturation and *cis/trans* configuration of long-chain FA on NF- $\kappa$ B activity in relation to insulin sensitivity in cultured skeletal muscle cells (chapter 3). Saturated FAs with a certain backbone (C16 or C18) were

compared to their mono-unsaturated [palmitoleic acid (C16:1), oleic acid (C18:1), elaidic acid (*trans*-9 C18:1), and vaccenic acid (*trans*-11 C18:1)] and poly-unsaturated [linoleic acid (C18:2), linolenic acid (C18:3), *cis*-9, *trans*-11 conjugated linoleic acid (CLA), and *trans*-10, *cis*-12 CLA] counterparts. Elaidic acid and *c9*, *t11*-CLA induced a 3-fold NF- $\kappa$ B transactivation, similar to the effects of palmitic acid and stearic acid, while *t10*, *c12*-CLA incubation even resulted in a 13-fold increase of NF- $\kappa$ B transactivation. Remarkably, none of these FAs induced skeletal muscle insulin resistance at the level of GLUT4 translocation or deoxyglucose uptake. These results demonstrated that the apparent association between SFA-induced NF- $\kappa$ B activation and insulin resistance in skeletal muscle cells is not applicable to long-chain FAs in general. Furthermore, this implied that FA-induced NF- $\kappa$ B activation is not sufficient for the induction of insulin resistance in skeletal muscle cells.

The capacity of skeletal muscle to contribute to glucose homeostasis depends on muscular insulin sensitivity. As the expression of glucose transporter (GLUT)-4 increases during myoblast differentiation, a process essential in the maintenance of the adult muscle, processes that affect muscle differentiation may influence insulin dependent glucose homeostasis. Inhibition of myogenic differentiation has been implicated in muscle atrophy and can be induced by pro-inflammatory cytokines, like TNF- $\alpha$  or IL-1 and is dependent on NF- $\kappa$ B activation. As we showed that FAs are strong inducers of NF- $\kappa$ B, we hypothesized in chapter 4 that *t10*, *c12*CLA (> 60-fold induction of NF- $\kappa$ B) reduces myogenic differentiation and consequently GLUT4 expression. The formation of myotubes was blocked after incubation of C2C12 myoblasts with *t10*, *c12*-CLA. This effect was accompanied by a reduced expression of muscle specific genes creatine kinase, myogenin, myosin heavy chain perinatal and myosin heavy chain IIB, as well as decreased GLUT4 mRNA levels. Genetic blockade of NF- $\kappa$ B was not sufficient to restore reduced myosin heavy chain protein expression following *t10*, *c12*-CLA treatment. Surprisingly, in contrast to myotubes, *t10*, *c12*-CLA was not able to activate NF- $\kappa$ B transcriptional activity in myoblasts. Thus, *t10*, *c12*-CLA inhibited myogenic differentiation and GLUT4 expression, independently from NF- $\kappa$ B activation.

Concerning the mechanism underlying the insulin resistance-inducing effects of palmitate, we demonstrated in chapter 5 that pharmacological inhibition of diacylglycerol acyltransferase (DGAT), the enzyme that converts DAG and acyl-CoAs into TAG, with amidepsine A resulted in DAG accumulation. Furthermore, DGAT inhibition resulted in a stronger reduction of insulin-stimulated deoxyglucose uptake in L6 myotubes with increasing palmitate concentrations. Similar effects were found after inhibition of carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1 by etomoxir, thereby preventing  $\beta$ -oxidation and stimulating DAG accumulation. These results support the concept that lipid metabolites like DAG play an important role in FA-induced insulin resistance in skeletal muscle cells. Although both inhibiting DGAT as well as inhibiting CPT-1 sensitized myotubes to palmitate-induced insulin resistance,

etomoxir co-incubation with palmitate increased NF- $\kappa$ B transactivation, whereas inhibiting DAG conversion did not increase palmitate-induced NF- $\kappa$ B transactivation. Based on these results, we concluded that it is unlikely that DAG is responsible for the NF- $\kappa$ B activation. Moreover, the apparent segregation of palmitate-induced NF- $\kappa$ B transactivation and insulin resistance suggested that NF- $\kappa$ B activation and induction of insulin resistance by palmitate were not causally linked. Furthermore, in chapter 5 we employed pharmacological and genetic approaches to inhibit NF- $\kappa$ B in order to definitively address the causality of NF- $\kappa$ B in palmitic acid-induced insulin resistance. Incubating myotubes with parthenolide, an agent preventing NF- $\kappa$ B activation by inhibiting IKK activity, could not prevent the palmitate-induced reduction of insulin-stimulated glucose uptake. In line with this, inhibiting the NF- $\kappa$ B pathway by genetic modification, using the I $\kappa$ B $\alpha$  super repressor, a non-degradable mutant of I $\kappa$ B $\alpha$ , did not improve insulin-stimulated glucose uptake after palmitate treatment. Altogether, this implies that palmitate-induced NF- $\kappa$ B activation and insulin resistance are not causally related in skeletal muscle cells.

In chapter 6, an overview of the current literature on the role of inflammatory signaling in skeletal muscle insulin resistance is given. Both intracellular inflammatory signaling in muscle cells as well as inflammatory processes originating from other tissues and their effects on skeletal muscle insulin sensitivity are discussed. Furthermore, potential dietary interventions to improve or prevent insulin resistance in muscle via interfering with inflammatory signaling are described.

In conclusion, the results described in this thesis indicate that activation of the NF- $\kappa$ B pathway in muscle does not play a causal role in fatty acid-induced skeletal muscle insulin resistance.



## Samenvatting





## SAMENVATTING

Insuline resistentie, dat gedefinieerd kan worden als een verminderd vermogen van cellen om te reageren op een fysiologische concentratie van insuline, speelt een belangrijke rol in de ontwikkeling van type 2 diabetes mellitus. Op dit moment lijden wereldwijd ongeveer 250 miljoen mensen aan diabetes en dit aantal blijft snel stijgen. De skeletspier speelt een cruciale rol bij het glucose metabolisme, aangezien 80% van de totale insuline-gestimuleerde glucose opname in de skeletspier plaatsvindt. Daarnaast ontstaat insuline resistentie in de spier voorafgaand aan de ontwikkeling van diabetes. De laatste decennia is duidelijk geworden dat verhoogde concentraties vrije vetzuren in het bloed geassocieerd zijn met insuline resistentie in de skeletspier. De moleculaire basis van skeletspier insuline resistentie is nog steeds niet volledig ontrafeld. Ondanks dat, zijn er aanwijzingen dat inflammatoire signaleringsroutes en de ophoping van lipide metaboliëten in de cel een belangrijke rol spelen. Het onderzoek dat in dit proefschrift is beschreven is gebaseerd op twee *in vitro* modellen voor skeletspier: de L6 rat skeletspier cellijn en de C2C12 muis skeletspier cellijn. In een serie experimenten werden de effecten van verschillende klasse vetzuren en de rol van lipide metaboliët accumulatie op insuline resistentie bepaald. Daarnaast hebben we de rol van NF- $\kappa$ B activatie (een belangrijke inflammatoire signaleringsroute) bij het ontstaan van insuline resistentie onderzocht.

Eerder onderzoek heeft laten zien dat het verzadigde lange keten vetzuur palmitinezuur insuline resistentie en NF- $\kappa$ B activatie induceert in spiercellen. Echter, een systematische evaluatie van de effecten van andere vetzuren, geclassificeerd naar ketenlengte, was afwezig. Daarom hebben we de effecten van verzadigde vetzuren van verschillende ketenlengte op insuline gevoeligheid en activatie van de NF- $\kappa$ B signaleringsroute onderzocht (hoofdstuk 2). Hiervoor hebben we gebruik gemaakt van L 6 en C2C12 cellen. Myoblasten werden gedifferentieerd in meerkernige myotubes, waarna deze geïncubeerd werden met vier verschillende vetzuren: caprylzuur (C8:0), laurinezuur (C12:0), palmitinezuur (C16:0) en stearinezuur (C18:0). De lange keten vetzuren C16:0 en C18:0 induceerden insuline resistentie, aangezien zowel de insuline-gestimuleerde GLUT4 translocatie als de insuline-gestimuleerde glucose opname afnamen. Echter, de myotubes die geïncubeerd werden met de middenlange keten vetzuren C8:0 en C12:0 bleven gevoelig voor insuline. Incubatie met C16:0 en C18:0 resulteerde daarnaast in een verhoging van de NF- $\kappa$ B activiteit in de spiercellen, terwijl de middenlange keten vetzuren deze effecten niet lieten zien. Deze resultaten laten zien dat NF- $\kappa$ B activatie door verzadigde vetzuren samengaat met insuline resistentie en dat deze twee processen afhankelijk zijn van de ketenlengte van het vetzuur.

Vervolgens onderzochten we of de associatie tussen NF- $\kappa$ B activatie en insuline resistentie na incubatie met verzadigde lange keten vetzuren,

doorgetrokken kon worden naar andere lange keten vetzuren. Daarom hebben we de effecten van verzadiging en *cis/trans* configuratie van lange keten vetzuren onderzocht. Vetzuren van dezelfde ketenlengte werden vergeleken met hun enkelvoudig en meervoudig onverzadigde equivalenten. Alleen de trans-isomeer van oliezuur, elaidinezuur, en twee geometrische en positionele isomeren van linolzuur, *c9*, *t11*-CLA en *t10*, *c12*-CLA, lieten een verhoging in NF- $\kappa$ B transactivatie zien. Ondanks dit, veroorzaakten geen van deze vetzuren insuline resistentie in de skeletspiercel op het niveau van GLUT4 translocatie of deoxyglucose opname. Deze resultaten demonstreerden dat de duidelijke associatie tussen NF- $\kappa$ B activatie en insuline resistentie na incubatie met verzadigde vetzuren, niet doorgetrokken kan worden naar lange keten vetzuren in het algemeen. Bovendien impliceerde dit dat vetzuur-geïnduceerde NF- $\kappa$ B activatie niet voldoende is voor het ontstaan van insuline resistentie in spiercellen.

De capaciteit van de skeletspier om bij te dragen aan de glucose homeostase hangt af van de insuline gevoeligheid van de spier. Aangezien de expressie van de glucose transporter (GLUT)-4 omhoog gaat gedurende spiercel differentiatie, een essentieel proces in het onderhoud van de volwassen spier, zouden processen die spier differentiatie beïnvloeden ook invloed kunnen hebben op insuline afhankelijke glucose homeostase. Inhibitie van spier differentiatie is beschreven betrokken te zijn bij spier atrofie en kan geïnduceerd worden door pro-inflammatoire cytokines zoals TNF- $\alpha$  of IL-1 en is afhankelijk van NF- $\kappa$ B activatie. Aangezien we aangetoond hebben dat vetzuren sterke activatoren zijn van NF- $\kappa$ B, hypothetiseerden we in hoofdstuk 4 dat *t10*, *c12* CLA (> 60-voudige NF- $\kappa$ B activatie) myogene differentiatie en GLUT4 expressie verlaagt. De vorming van myotubes werd geremd na incubatie van C2C12 myoblasten met *t10*, *c12* CLA. Dit effect werd vergezeld door een verminderde expressie van spierspecifieke genen en verlaagde GLUT4 mRNA niveaus. Genetische blokkade van NF- $\kappa$ B bleek niet voldoende om de gereduceerde myosin heavy chain eiwit expressie na *t10*, *c12*-CLA behandeling te herstellen. Het was verrassend dat *t10*, *c12*-CLA niet in staat was transcriptionele NF- $\kappa$ B activiteit in myoblasten te activeren, dit in tegenstelling tot myotubes. Concluderend inhibeerde *t10*, *c12*-CLA de spierdifferentiatie en GLUT4 expressie onafhankelijk van NF- $\kappa$ B activatie.

Hoofdstuk 5 beschrijft het verdere onderzoek dat we hebben verricht naar de onderliggende mechanismen van de insuline resistentie inducerende effecten van palmitinezuur. Farmacologische remming van diacylglyceroltransferase (DGAT), het enzym dat DAG en acyl-CoA omzet naar TAG, met amidepsine A resulteerde in DAG ophoping. Bovendien resulteerde DGAT remming in een sterkere afname van insuline gestimuleerde deoxyglucose opname in L6 myotubes bij oplopende palmitinezuur concentraties. Vergelijkbare effecten werden gevonden na inhibitie van carnitine palmitoyltransferase (CPT)-1 met etomoxir, waardoor  $\beta$ -oxidatie werd voorkomen en DAG ophoping werd gestimuleerd. Deze resultaten ondersteunen de

opvatting dat lipide metabolieten zoals DAG een belangrijke rol spelen in vetzuur geïnduceerde insuline resistentie in skeletspiercellen. Zowel remming van DGAT als remming van CPT-1 sensibiliseerde myotubes naar palmitinezuur-geïnduceerde insuline resistentie. Echter, co-incubatie van palmitinezuur met etomoxir verhoogde NF- $\kappa$ B transactivatie, terwijl inhibitie van DAG conversie palmitinezuur-geïnduceerde NF- $\kappa$ B transactivatie niet verhoogde. Gebaseerd op deze resultaten concludeerden we dat het onwaarschijnlijk is dat DAG verantwoordelijk is voor de NF- $\kappa$ B activatie. Bovendien suggereerde de gedemonstreerde segregatie van NF- $\kappa$ B transactivatie en insuline resistentie dat activatie van de NF- $\kappa$ B cascade en de inductie van insuline resistentie door palmitinezuur niet causaal verbonden zijn. Vervolgens werd zowel een farmacologische als een genetische aanpak gebruikt om een definitieve uitspraak te kunnen doen over eventuele causaliteit van NF- $\kappa$ B activatie in door palmitaat veroorzaakte insulineresistentie. Parthenolide, een IKK remmer, kon insuline resistentie na toediening van palmitaat niet voorkomen. In overeenstemming met dit resultaat, liet remming van de NF- $\kappa$ B cascade met behulp van de I $\kappa$ B $\alpha$  super repressor, een niet afbreekbare mutant van I $\kappa$ B $\alpha$ , ook geen herstel van palmitaat-geïnduceerde insuline resistentie zien. Deze resultaten impliceren dat NF- $\kappa$ B activatie en insulineresistentie in skeletspiercellen na palmitaat toediening niet met elkaar verbonden zijn.

Hoofdstuk 6 geeft een overzicht van de huidige literatuur over de rol van inflammatie in skeletspier insuline resistentie. Zowel inflammatoire processen in de spiercel als inflammatoire processen die hun oorsprong hebben in andere organen en hun effect uitoefenen op insuline gevoeligheid in de spier, worden bediscussieerd. Daarnaast worden potentiële voedingsinterventies die insuline resistentie in de spier kunnen voorkomen of verminderen besproken.

Samengevat laten de resultaten zoals beschreven in dit proefschrift zien dat activatie van de NF-  $\kappa$ B cascade in spier geen causale rol speelt in vet geïnduceerde insuline resistentie in de skeletspier.